

# KŘENOVOU PEROXIDÁZOU MODIFIKOVANÉ NANOČÁSTICE A JEJICH VYUŽITÍ V ELEKTROCHEMICKÝCH IMUNOSENZORECH

Aneta Kovářová, Michaela Čadková, Veronika Dvořáková, Zuzana Bílková  
a Lucie Korecká

Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita  
Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice

## Abstract

This work aimed in biofunctionalization of carboxylate nanoparticles (NPs-COOH) with enzyme horseradish peroxidase (HRP) for subsequent nanolabelling of specific antibody in ELISA – based immunosensors. Finally prepared conjugate (anti-ApoE IgG<sup>NPs-HRP</sup>) was applied for electrochemical detection of antigen apolipoprotein E (ApoE).

## Souhrn

Cílem práce bylo funkcionalizovat nanočástice s karboxylovou funkční skupinou (NPs-COOH) enzymem křenovou peroxidázou (HRP), kterými byly následně značeny sekundární protilátky pro imunosenzory pracující na principu ELISA metody. Připravený konjugát (anti-ApoE IgG<sup>NPs-HRP</sup>) byl poté použit pro elektrochemickou detekci antigenu apolipoproteinu E (ApoE).

## 1. Úvod

Pro analytický průkaz a kvantifikaci antigenů v biologickém materiálu se osvědčila tradiční metoda sendvičové enzymové imunoanalýzy (ELISA). Metoda je založena na specifické interakci mezi antigenem a protilátkou za tvorby imunokomplexu. Imunokomplex je následně kvantifikován prostřednictvím reakce s druhou, tzv. sekundární protilátkou, na kterou je kovalentně navázán enzym. Ten generuje po přidavku vhodného substrátu měřitelný signál. Mezi enzymy, které jsou nejčastěji pro metodu ELISA využívány, patří  $\beta$ -galaktosidáza, glukózaoxidáza, křenová peroxidáza či alkalická fosfatáza. V heterogenním uspořádání je protilátka před záchytem antigenu ukotvena na pevné fázi, kterou obvykle tvoří jamky mikrotitrační destičky nebo stále častěji také magnetické částice. Použití magnetických částic zaručuje jednoduchou a rychlou separaci složek a šetrnou manipulaci se vzorkem během analýzy [1,2,3,4].

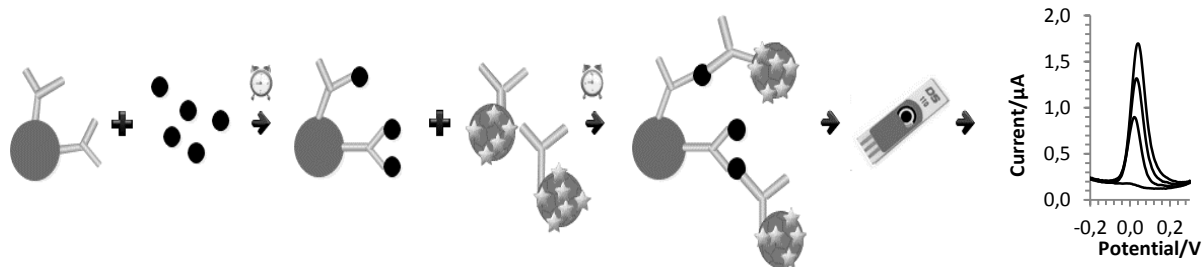
Pro vlastní detekci vzniklého imunokomplexu jsou, v závislosti na použitém substrátu zvoleného enzymu, využívány nejčastěji spektrofotometrická, chemiluminiscenční a v poslední době také elektrochemická detekce. Volba vhodné detekční metody se také odvíjí

od stanovovaného antigenu, resp. jeho očekávaného koncentračního rozmezí. Zájem o využití imunosenzorů s elektrochemickou detekcí stále roste, neboť s jejich pomocí lze dosáhnout nejen nízkých detekčních limitů s nízkou spotřebou reagensů a vzorku, ale na rozdíl od spektrofotometrie není detekce ovlivněna zákalem vzorku nebo interferencí dalších látek. Toto je obzvláště výhodné zejména v analýze biologicky aktivních látek, které jsou obvykle součástí komplexní matrice (tělní tekutiny, potraviny, vzorky z oblasti životního prostředí apod.) [5,6,7]. Elektrochemické biosenzory (amperometrické, voltametrické) také využívají relativně levných přístrojů, které mohou být snadno miniaturizovány a konstruovány jako přenosná zařízení vhodná i pro tzv. terénní měření (point-of-care testing, POCT) [8].

V současné době je velká snaha dosáhnout u enzymových imunosenzorů nižších limitů detekce než doposud. Jednou z možností je použít nanočástice jako nosiče pro vyšší počet molekul indikátoru, tj. enzymu a teprve poté vázat tento komplex kovalentně se specifickou protilátkou. Nanočástice s velkým specifickým povrchem tak umožní navázat větší počet molekul enzymu a tím dosáhnout vyšší citlivost celého stanovení. Vlastnosti vhodné pro tvorbu výše popsaného konjugátu mají například funkcionalizované mezoporézní silika nanočástice. Výhodou je jejich velká plocha, kontrolovaná struktura pórů, vysoká tepelná a mechanická stabilita [9,10,11].

Křenová peroxidáza je vysoce specifický a stabilní enzym, který v rámci imunochemické reakce mění substrát na elektrochemicky měřitelný produkt [12]. Enzym našel uplatnění v mnoha dalších aplikacích, např. koimobilizace křenové peroxidázy s elektronovým mediátorem se v analytické praxi osvědčila. Mediátor je zde přidáván s cílem zvýšit dostupnost aktivního místa pro efektivní přenos elektronů a tak zrychlit elektrochemickou reakci [9,13].

Modelový biospecifický pár proteinu apolipoproteinu E (antigen) a odpovídající specifické protilátky (anti-ApoE IgG) byl základem pro vývoj nové imunoanalytické metody s možností elektrochemické detekce. Hlavním cílem bylo ověřit předpoklad, že se díky specifické protilátce konjugované s nanočásticemi biofunkcionalizovanými molekulami křenové peroxidázy zvýší citlivost elektrochemické detekce nádorových markerů v biologickém materiálu (viz obrázek 1).



Obrázek 1: Schéma přípravy elektrochemického biosenzoru pro detekci antigenu apolipoproteinu E

## 2. Experimentální část

### 2.1. Chemikálie a zařízení

Křenová peroxidáza, mezoporézní silika nanočástice s karboxylovými funkčními skupinami (200 nm), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC), N-hydroxysulfosuccinimid sodný (S-NHS), *o*-fenylendiamin, 30% peroxid vodíku, thionin acetát (ThAc) byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Karboxylované polymethylmetakrylátové nanočástice (392 nm) byly poskytnuty Ústavem makromolekulární chemie Akademie věd České republiky. Lidský rekombinantní protein ApoE3 produktem BioVision (USA). Monoklonální i polyklonální králičí protilátky anti-ApoE IgG byly dodány firmou Moravian-Biotechnology (Česká republika). Magnetické částice SiMAG – carboxyl (0,75 μm) byly zakoupeny od společnosti Chemicell (Německo). Ostatní chemikálie analytické čistoty byly od společností Sigma-Aldrich (USA), Penta (Česká republika), Lach-Ner (Česká republika) nebo Bio-Rad (CA, USA).

Elektrochemická měření byla prováděna s využitím potenciostatu PalmSens (PalmSens, Nizozemí), softwaru PSTrace 4.7 a pomocí tříelektrodových tištěných senzorů s platinovou pracovní elektrodou, argentochloridovou referentní a platinovou pomocnou elektrodou (BST, Německo).

### 2.2. Modifikace nanočástic křenovou peroxidázou

3 U, 15 U, 30 U, 75 U nebo 150 U HRP enzymu křenové peroxidázy bylo kovalentně imobilizováno na nanočástice s karboxylovými funkčními skupinami pomocí jedнокrokové karbodiimidové metody s využitím 7,5 mg EDC a 1,25 mg S-NHS v prostředí 0,1M fosfátového pufru pH 7,3. Vazba probíhala přes noc při 4°C za mírného otáčení na rotátoru [14]. Pro vazbu byly vybrány nanočástice z ÚMCH, komerční částice poskytla firma Sigma-Aldrich, jejichž parametry jsou uvedené v tabulce 1. Po inkubaci byly nanočástice promyty 5x

1 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,3, přičemž byly nanočástice promývány centrifugací při 5000 rpm po dobu 5 minut na každé promytí.

Tabulka 1: Charakteristiky použitých nanočástic

	Nanočástice		
	PCMMA	PCMMA-ThAc	Komerční
<b>Materiál</b>	polymethylmetakrylát	polymethylmetakrylát	silika
<b>Funkční skupiny</b>	- COOH	- COOH	- COOH
<b>Velikost (nm)</b>	392	392	200
<b>Velikost pórů (nm)</b>	informace nebyla poskytnuta		4
<b>Thionin</b>		inkorporován	
<b>Výrobce</b>	ÚMCH, AV ČR	ÚMCH, AV ČR	Sigma Aldrich, MO, USA

### 2.3. Modifikace nanočástic křenovou peroxidázou a thioninem

Vedle imobilizace HRP samotné byla provedena i koimobilizace HRP (3 U, 15 U, 30 U, 75 U nebo 150 U) s elektronovým mediátorem thionin acetátem (ThAc; 0,5mM nebo 0,05mM). Ke koimobilizaci byly použity nanočástice PCMMA a komerční. Prvním přístupem byla současná koimobilizace HRP a ThAc, dalším vazba HRP a po 15 minutách imobilizace ThAc a posledním přístupem byla vazba ThAc a po 15 minutách imobilizace HRP. Opět byly imobilizace prováděny jednokrokovou karbodiimidovou metodou s využitím 7,5 mg EDC a 1,25 mg S-NHS v prostředí 0,1M fosfátového pufru pH 7,3. Vazba probíhala přes noc při 4°C za mírného otáčení na rotátoru [14]. Po inkubaci byly nanočástice promyty 5x 1 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,3, přičemž byly nanočástice promývány za pomoci centrifugace při 5000 rpm po dobu 5 minut na každé promytí.

### 2.4. Ověření aktivity imobilizované křenové peroxidázy

Pro ověření aktivity imobilizované křenové peroxidázy bylo 100 µg takto modifikovaných nanočástic promyto 0,1M fosfátovým puforem pH 6,2. Po promytí byl přidán substrátový roztok obsahující 10 µl 30% peroxidu vodíku (substrát) + 10 mg *o*-fenylendiaminu (chromogen). Suspenze byla inkubována 10 minut při 37°C za mírného otáčení. Po inkubaci byla reakce zastavena přidávkem 50 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Byla změřena absorbance při 492 nm na spektrofotometru (Multiscan, RC, Genesis, Labsystems).

### 2.5. Konjugace polyklonálních anti-ApoE IgG HRP-modifikovanými nanočásticemi

Konjugace 25 µg polyklonálních králičích protilátek anti-ApoE s 300 µg HRP-modifikovanými nanočásticemi (případně HRP-nanočásticemi modifikovanými thioninem)

byla provedena jednkrokovou karbodiimidovou metodou v prostředí 0,1M fosfátového pufru pH 7,3. Vazba probíhala přes noc při 4°C za mírného otáčení na rotátoru za stejných podmínek uvedených v kapitole 2.2.

## 2.6. Imobilizace proteinu ApoE či monoklonálních anti-ApoE IgG na magnetické částice

1 mg částic byl promyt 5x 1 ml 50mM MES pufru pH 5, k promývání bylo využito magnetického separátoru. Následně bylo k promyтым magnetickým částicím přidáno 7,5 mg EDC a 1,25 mg S-NHS. Inkubace směsi probíhala 30 minut při pokojové teplotě na rotátoru. K preaktivovaným částicím bylo přidáno 25 µg antigenu ApoE nebo 100 µg králíčích anti-ApoE IgG a reakční objem byl doplněn 50mM MES pufrům pH 5 na 1 ml. Inkubace probíhala přes noc za mírného otáčení při 4°C. Po inkubaci následovalo promytí 2x 1 ml 50mM MES pufrům pH a následně 2x 1 ml PBS pufrům pH 7,4.

## 2.7. Elektrochemická detekce HRP-modifikovaných nanočástic

Ke 100 µl suspenze s HRP-modifikovanými nanočásticemi bylo přidáno 800 µl substrátu peroxidu vodíku o koncentraci 10 mg/l v 0,1M fosfátovém pufru s 0,15M NaCl. Následně bylo 40 µl vzorku nanášeno formou kapky na povrch tištěného tříelektrodového senzoru s platínovou pracovní elektrodou. Měřil se pokles proudové odezvy vlivem spotřebování substrátu peroxidu vodíku o koncentraci 10 mg/l v 0., 5., 10., 15. minutě metodou lineární voltametrie (podmínky měření viz tabulka 2), přičemž mezi jednotlivá měření byly zařazeny promývací kroky. Hodnoty proudové odezvy byly odečítány v 0,35 V.

Tabulka 2: Podmínky měření

E <sub>begin</sub>	0 V
E <sub>end</sub>	0,8 V
E <sub>step</sub>	0,005 V
E <sub>cond</sub>	0 V
E <sub>dep</sub>	0 V
scan rate	0,05 V/s
t <sub>cond</sub> , t <sub>dep</sub>	0 s
t <sub>eq</sub>	2 s

## 2.8. Elektrochemické ověření funkčnosti konjugátu anti-ApoE IgG<sup>HRP-NPs</sup>

Prvním krokem bylo najít vhodné ředění konjugátu pro vlastní měření na biosenzoru. Použil se 1 µg antigenu ApoE navázaného na magnetických částicích SiMAG-COOH, ke kterým byl přidán blokační roztok (obsahující 0,1% hovězí sérový albumin a 0,05% TWEEN 20) a 10x, 20x nebo 50x zředěný konjugát v 0,1M uhličitanovém pufru pH 9,49. Reakční

směs byla inkubována po dobu 50 minut a následně promyta 0,1M fosfátovým pufrům pH 7,3 s přídatkem 0,15M NaCl, který snížil nespecifickou sorpci látek na povrchu magnetických částic. Po promytí reakční směsi bylo nutno odebrat supernatant a přidat 800 µl substrátu peroxidu vodíku o koncentraci 10 mg/l v 0,1M fosfátovém pufru s 0,15M NaCl. Pro měření na tištěných senzorech bylo nutno magnetické částice s navázaným komplexem odseparovat s pomocí magnetického separátoru, neboť by magnetické částice mohly elektrochemickou detekci ovlivnit. Následné měření bylo prováděno za podmínek uvedených v kapitole 2.7.

## **2.9. Elektrochemická detekce antigenu s využitím připraveného konjugátu anti-ApoE IgG<sup>HRP-NPs</sup>**

Pro stanovení množství antigenu ve vzorku pomocí MELISA metody byly jako nosič použity magnetické částice SiMAG-COOH s imobilizovanými monoklonálními protilátkami anti-ApoE. Samotná MELISA byla provedena následovně. Magnetické částice s 10 µg primární protilátky anti-ApoE byly promyty 5x 500 µl 0,1M fosfátového pufru pH 7,3. Po promytí a odtažení supernatantu, byl k magnetickým částicím s primárními protilátkami anti-ApoE přidán blokační roztok (0,1% hovězí sérový albumin a 0,05% TWEEN 20 v 0,1M fosfátovém pufru pH 7,3) a odpovídající množství antigenu ApoE (5, 2,5 nebo 1 µg), poté byla směs doplněna do 500 µl 0,1M fosfátovým pufrům pH 7,3. Reakční směs byla inkubována po dobu 50 minut při 37°C za mírného otáčení na rotátoru. Po inkubaci byly částice promyty 3x 500 µl 0,1M uhličitanového pufru pH 9,49. Po promytí a odtažení supernatantu byl přidán blokační roztok (0,2% BSA a 0,1% TWEEN 20 v 0,1M uhličitanovém pufru pH 9,49), 20x zředěný konjugát (25 µl) a suspenze byla doplněna do 500 µl 0,1M uhličitanovým pufrům pH 9,49. Reakční směs byla inkubována opět po dobu 50 minut při 37°C za mírného otáčení na rotátoru. Po inkubaci byl vytvořený imunokomplex promyt 0,1M uhličitanovým pufrům pH 9,49 a 0,1M fosfátovým pufrům pH 7,3 s přídatkem 0,15M NaCl. Po promytí byl přidán substrát peroxidu vodíku o koncentraci 1 mg/l byla měřena proudová odezva dle podmínek uvedených v kapitole 2.7.

## **3. Výsledky a diskuze**

Konkrétním cílem a náplní této práce byla příprava konjugátů, tj. protilátek značených HRP-modifikovanými nanočásticemi. Kvalita připraveného konjugátu byla ověřena elektrochemickým stanovením na tištěných elektrodách. Druhým krokem bylo ověření funkčnosti konjugátu prostřednictvím vazby na magnetické částice s imobilizovaným antigenem ApoE s následným elektrochemickým ověřením. Poslední krok sloužil k ověření

průkazu záchytu antigenu ApoE ve vzorku prostřednictvím sendvičové MELISA metody a elektrochemické detekce.

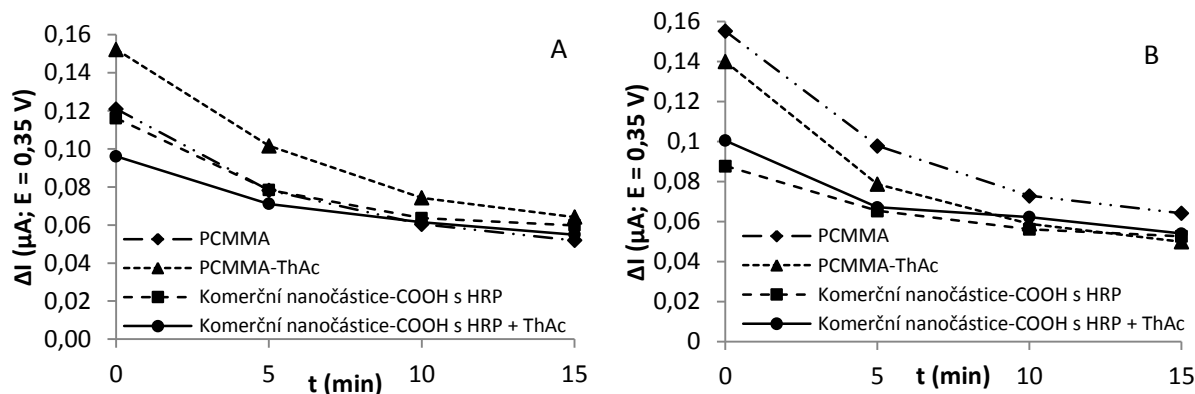
Jak již bylo uvedeno, v práci bylo testováno několik druhů nanočástic dodaných partnerem projektu Ústavem makromolekulární chemie AV ČR. Komerční silika nanočástice od společnosti Sigma-Aldrich byly použity jako funkční standard.

Klíčovým krokem byla účinná, ale kontrolovaná vazba molekul enzymu na nanočástice. Bylo imobilizováno 75 U nebo 150 U HRP na 1 mg nanočástic, 3 typy použitých nanočástic jsou uvedeny v tabulce č. 1. Pro zjištění efektu thioninu byly připraveny nanočástice (PCMMA a komerční) s kovalentně navázanými molekulami HRP a ThAc (viz kapitola 2.3) a též byly využity nanočástice s inkorporovaným thioninem z ÚMCH (PCMMA-ThAc). Následně byla hodnocena aktivita imobilizované křenové peroxidázy spektrofotometricky. Nejvyšší aktivity HRP (163 – 211 mU/mg částic) byly stanovovány na komerčních silika nanočásticích. U nanočástic PCMMA byly provedeny 3 různé způsoby koimobilizace HRP s thioninem (viz kapitola 2.3.) a nejvyšší aktivity HRP byly dosaženy při okamžité imobilizaci HRP a následné vazbě ThAc (viz tabulka 3). Pozorované snížení enzymové aktivity HRP při koimobilizaci lze přisoudit vazbě thioninu, předpokládáme, že thionin zablokoval část volných funkčních skupin na nanočásticích.

Tabulka 3: Aktivita imobilizované HRP na PCMMA a komerčních nanočásticích

	c (mU/1 mg PCMMA)	c (mU/1 mg komerčních NPs)
HRP + ThAc → inkubace	38,7	
HRP → inkubace → ThAc	42,6	173,5
ThAc → inkubace → HRP	38,3	

Následně byla odezva 100 µg HRP-modifikovaných nanočástic (též HRP-thionin-modifikovaných částic) ověřena elektrochemicky, přičemž byl sledován pokles proudové odezvy vlivem spotřebování substrátu peroxidu vodíku o koncentraci 10 mg/l. Měření probíhalo s využitím tištěného tříelektrodového senzoru s platinovou pracovní elektrodou a potenciostatu PalmSens. Pro každé měření byla využita nová tištěná elektroda a byl sestaven graf závislosti proudové odezvy na čase. Ze souhrnných grafů je patrný pokles proudové odezvy v čase (viz obrázek 2). Hodnoty proudové odezvy pro jednotlivé nanočástice byly odečítány v 10. minutě, neboť v tomto čase lze považovat systém za ustálený.



Obrázek 2: Závislost proudové odezvy při spotřebě substrátu peroxidu vodíku ( $c = 10 \text{ mg/l}$ ) účinkem HRP-modifikovaných nanočástic v 0., 5., 10. a 15. minutě: A) pro imobilizaci bráno 75 U HRP a B) pro imobilizaci bráno 150 U HRP

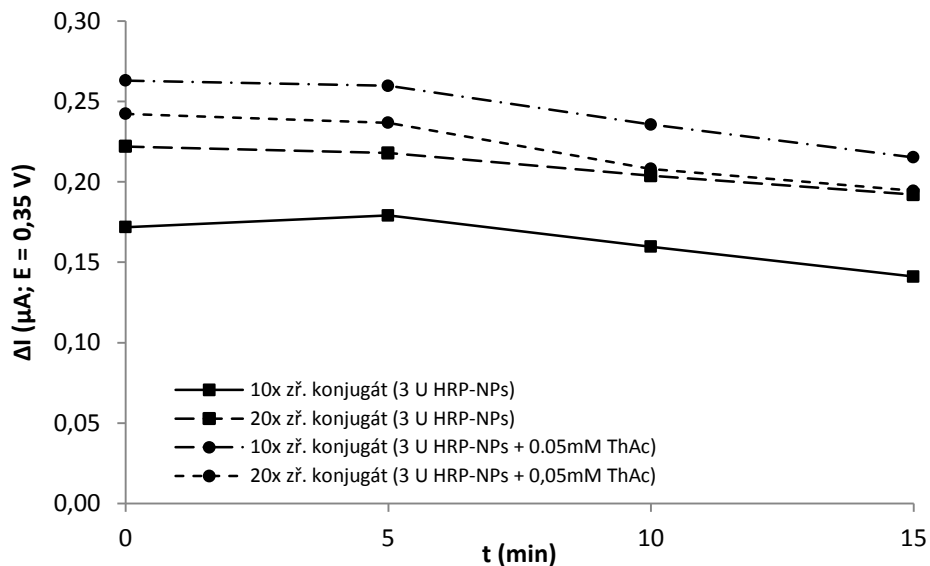
Z výsledků je patrné, že nelze upřednostnit jeden typ částic, neboť všechny mají v 10. minutě obdobnou proudovou odezvu bez ohledu na předchozí aktivitu imobilizované křenové peroxidázy. Též kovalentně navázaný či inkorporovaný thionin odezvu nezlepšil. Pro prvotní aplikace byly porovnávány pouze nanočástice s původně imobilizovanými 75 U a 150 U HRP. I přes rozdílné množství enzymu HRP byla elektrochemická odezva srovnatelná.

Na základě těchto výsledků jsme přikročili k vlastní vazbě enzymově aktivních nanočástic se specifickou protilátkou, anti-ApoE IgG. Pro tuto vazbu byly použity nanočástice s 3 U, 15 U, 30 U a 75 U imobilizované HRP. Po ověření aktivity spektrofotometricky byly z dalších aplikací vyřazeny nanočástice PCMMA z ÚMCH s původně imobilizovanými 3 U HRP, neboť jejich enzymová aktivita byla nulová. Účinnost vazby protilátek na nanočástice byla ověřována metodou SDS-PAGE s následným denzitometrickým vyhodnocením. U všech typů nanočástic modifikovaných 30 U a 75 U HRP, nedošlo k účinné vazbě s molekulami IgG. Příčinou může být nedostatek volných funkčních skupin na povrchu nanočástic pro další vazbu. U nanočástic PCMMA a PCMMA-ThAc z ÚMCH, bez ohledu na množství imobilizované HRP či přítomnost/nepřítomnost thioninu, nedošlo k vazbě s protilátkami. Z výsledků vyplývá, že se protilátky úspěšně vázaly s komerčními nanočásticemi s 3 U a 15 U HRP, jak s přítomností/nepřítomností thioninu, přičemž účinnost vazby se pohybovala v relativně širokém rozmezí 4 - 50 %. Tyto 4 funkční konjugáty jsme následně využili v dalších aplikacích.

Antigenem (ApoE) modifikované magnetické částice (SiMAG-COOH) byly použity pro ověření vazebné funkčnosti připravených konjugátů, tj protilátek značených enzymem modifikovanými nanočásticemi. Účinnost imobilizace antigenu na magnetické částice byla ověřena elektroforeticky a bylo dosahováno až 90% účinnosti. Pro vlastní elektrochemickou detekci byla testována reakce mezi 1  $\mu\text{g}$  antigenu ApoE navázaného na magnetických



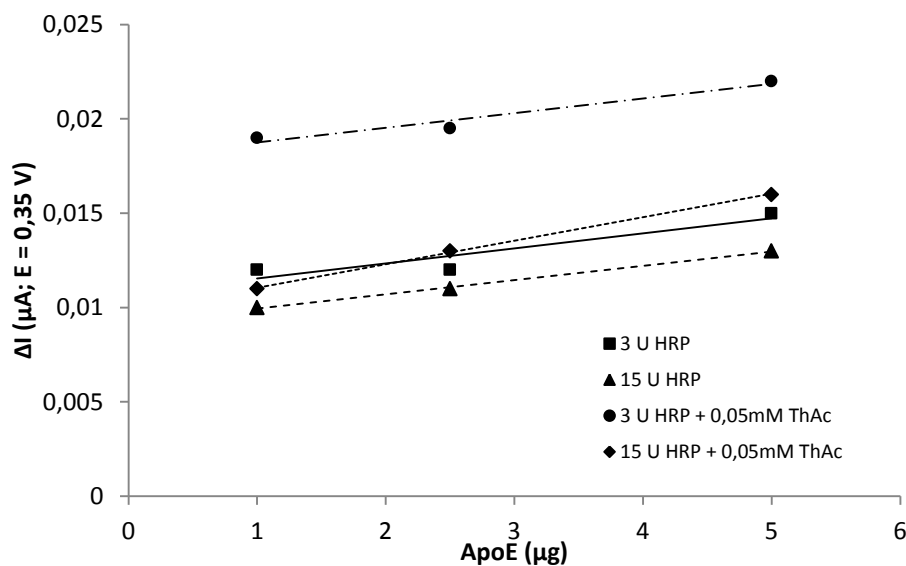
částicích a vhodně naředěným konjugátem (10x a 20x), u kterého bylo pro vazbu použito 3 U HRP/1 mg nanočástic (viz obrázek 3). Pro testování ředění byl úmyslně vybrán tento jeden konkrétní konjugát, neboť zde byla ověřena nejvyšší účinnost vazby polyklonálních protilátek na nanočástice modifikované HRP, a to 50 %.



Obrázek 3: Závislost proudové odezvy na čase vlivem spotřeby substrátu peroxidu vodíku ( $c = 10 \text{ mg/l}$ ) účinkem 10x a 20x zředěného konjugátu značeného HRP-modifikovanými nanočásticemi (s/bez thioninu) navázaného na 1  $\mu\text{g}$  ApoE na SiMAG-COOH magnetických částicích

Proudová odezva 10x a 20x zředěného konjugátu, odečítaná v 10. minutě, byla pro oba typy konjugátů srovnatelná. Využití thioninu koimobilizovaného s HRP na nanočástice vedlo sice k mírnému zvýšení proudové odezvy při elektrochemické detekci, nicméně efekt nebyl tak výrazný, jak se předpokládalo na základě podobných studií zmíněných v literatuře [9,13,15]. Pro další experimenty byl vybrán 20x zředěný konjugát.

Poslední krok sloužil k ověření průkazu záchytu antigenu ApoE ve vzorku prostřednictvím sendvičové MELISA metody a elektrochemické detekce. Nejprve bylo nutno připravit imunosorbent skládající se z monoklonálních anti-ApoE protilátek navázaných na magnetických částicích SiMAG-COOH. I v tomto případě byla účinnost vazby ověřována prostřednictvím SDS-PAGE a bylo dosahováno účinnosti vazby 90-95 %. K připravenému imunosorbentu bylo přidáno určité množství antigenu (1  $\mu\text{g}$ , 2,5  $\mu\text{g}$  nebo 5  $\mu\text{g}$ ) a vzniklý imunokomplex byl následně vizualizován pomocí připraveného konjugátu tvořeného sekundární protilátkou anti-ApoE (IgG) konjugovanou s HRP-modifikovanými nanočásticemi (anti-ApoE IgG<sup>HRP-NPs</sup>). Elektrochemická měření probíhala s využitím substrátu peroxidu vodíku o koncentraci 1 mg/l. Ze získaných výsledků byla sestavena závislost proudové odezvy odečítané v 10. minutě, při potenciálu 0,35 V, na množství antigenu ApoE ve vzorku (viz obrázek 4).



Obrázek 4: Kalibrační závislost proudové odezvy, odečítané v 10. minutě při potenciálu 0,35 V, na množství antigenu ApoE (1 μg, 2,5 μg, 5 μg) při použití daných typů konjugátů sestavených z HRP-modifikovaných nanočástic

Z výsledků je patrné, že systém pro stanovení antigenu ApoE lze tedy považovat za funkční. Konjugát protilátek s nanočásticemi modifikovanými HRP a thioninem pomohl zvýšit odezvu signálu elektrochemické detekce pouze minimálně. Opět ani množství imobilizované HRP neovlivnilo citlivost detekce. Vytvořené konjugáty jsou funkční a další možnost jejich využití je v průkazu antigenu v biologických vzorcích.

## Závěr

Cílem práce bylo sestavení funkčních konjugátů tvořených z HRP-modifikovaných nanočástic a protilátek, které by umožnily prostřednictvím sendvičové MELISA metody detekci antigenu ApoE. Prvním krokem bylo ověření kvality vytvořených HRP konjugátů s využitím elektrochemické detekce, kde konjugáty poskytovaly srovnatelné proudové odezvy bez ohledu na typ částic či množství imobilizované HRP (popř. i thioninu). Následně byla ověřována vazebná funkčnost konjugátu prostřednictvím vazby na antigen imobilizovaný na magnetické částice. K úspěšné vazbě došlo pouze u konjugátů tvořenými HRP-modifikovanými komerčními nanočásticemi. Tyto konjugáty byly dále využity pro detekci solubilního antigenu. Z výsledků vyplývá, že sestavené konjugáty byly funkční, nicméně citlivost detekce byla pouze v mikrogramech, což je vhodné pouze pro některé biomarkery, ani elektronový mediátor thionin nepřispěl k výraznému zvýšení detekce.

## **Poděkování**

Tato práce byla financována z prostředků Grantové agentury České Republiky projekt No. 15-16549S a z prostředků SGS\_2016\_004.

## **Literatura**

- [1]: Aydin S.: *Peptides* 72 (2015) 4-15
- [2]: Meza M.: *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers* (1997) 303-309
- [3]: Yoon J.Y.: *Introduction to Biosensors*. Springer (2013)
- [4]: Chikkaveeraiah B. V., Bhirde A., Morgan N. Y., Eden H. S., and Chen X. *ACS Nano* 6 (8) (2012) 6546–6561
- [5]: Kokkinosa Ch., Economou A., Prodromidis M. I.: *TrAC* 79 (2016) 88–105
- [6]: Wilson M. S.: *Analytical Chemistry* 7 (5) (2005) 1496-1502
- [7]: Bahadır E. B., Sezgintürk M. K.: *Talanta* 132 (2015) 162-174
- [8]: Wang J.: *Biosensors and Bioelectronics* 21 (10) (2006) 1887-1892
- [9]: Yang, M., Li H., Javadi A., Gong S.: *Biomaterials* 31 (12) (2010) 3281-3286
- [10]: Knopp D., Tang D., Niessner R.: *Analytica Chimica Acta* 647 (1) (2009) 14–30
- [11]: Liberman A., Mendez N., Trogler W. C., Kummel A. C.: *Surface Science Reports* 69 (2-3) (2014) 132–158
- [12]: Veitch N.C.: *Phytochemistry* 65 (3) (2004) 249-259
- [13]: Thenmozhi K., Narayanan S. S.: *Sensors and Actuators B: Chemical* 125 (1) (2007) 195–201
- [14]: Čadková M.: *Analytical Biochemistry* 484 (2015) 4-8
- [15]: Wu D., Li R., Wang H., Liu S., Wang H., Wei Q., Du B.: *Analyst* 137 (3) (2012) 608-613